



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :

A61K 31/365

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/20704

(43) Date de publication internationale:

11 juillet 1996 (11.07.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00015

(22) Date de dépôt international: 4 janvier 1996 (04.01.96)

(30) Données relatives à la priorité:

9500024.6

4 janvier 1995 (04.01.95)

GB

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ DE
CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS
SCIENTIFIQUES (SCRAS) [FR/FR]; 51/53, rue du
Docteur-Blanche, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BRAQUET, Pierre
[FR/FR]; 8, rue des Suisses, F-92380 Garches (FR). BIGG,
Denis [FR/FR]; 8, rue Neuve, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP,
KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM,
TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW,
SD, SZ, UG), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
reçues.*

(54) Title: TREATING DISORDERS CHARACTERISED BY EXCESSIVE CELL PROLIFERATION WITH SCLAREOLIDE

(54) Titre: TRAITEMENT D'AFFECTIONS CARACTERISEES PAR UNE PROLIFERATION EXCESSIVE DES CELLULES AVEC
SCLAREOLIDE

(57) Abstract

A method for treating a disorder characterised by excessive cell proliferation in a patient by administering to the patient a therapeutically
effective amount of (+)sclareolide.

(57) Abrégé

Une méthode de traitement d'une affection caractérisée par une prolifération excessive de cellules chez un patient, ladite méthode
comportant l'administration audit patient d'une quantité thérapeutiquement efficace de (+)sclérolide.

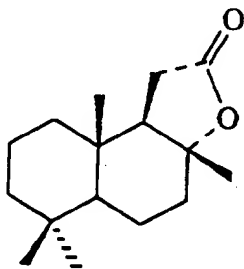
UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

TRAITEMENT D'AFFECTIIONS CARACTERISEES PAR UNE PROLIFERATION
EXCESSIVE DES CELLULES AVEC SCLAREOLIDE

La (+)sclaréolide, [3aR-(3a α , 5a β , 9a α , 9b α)]-décahydro-3a,6,6,9a-tetraméthylnaphto [2,1-b] furane-2(1H)-one est un terpénoïde bicyclique naturel que l'on trouve, par exemple, dans le tabac. Kaneko, H., Agr. Biol. Chem. 35(9) : 1461 (1971). La (+)sclaréolide a la structure suivante :



5 La (+)sclaréolide est connue pour augmenter ou développer les propriétés organoleptiques des produits alimentaires. Voir par exemple les brevets U.S. Nos. 4.917.913, 4.960.603, 4.966.783, 4.988.527 et 4.999.207. Ce composé a été utilisé comme parfum pour les cigarettes (brevet japonais No. 60/123,483) et comme additif pour éliminer le goût amer du café (brevet U.S. No. 4.988.532).

10 Cependant, à la connaissance de la déposante, la (+)sclaréolide n'a jamais été utilisée ou présentée comme un composé pharmacologiquement actif.

15 La présente invention concerne une méthode pour inhiber une affection caractérisée par une prolifération excessive de cellules chez un patient (par exemple, un mammifère tel que l'homme), comprenant l'administration au patient d'une quantité thérapeutiquement efficace de (+)sclaréolide.

Dans une configuration, le patient souffre d'une affection associée à une prolifération excessive de cellules bénigne (c'est-à-dire non maligne). Des exemples de telles affections sont la fibrose, l'hyperplasie prostatique bénigne, l'athérosclérose, la

resténose, la glomulérosclérose, la chéloïde, le psoriasis et d'autres affections de la peau et maladies néo-plastiques non malignes.

Dans une autre configuration, le patient souffre d'une affection associée à une prolifération excessive de cellules maligne (par exemple le cancer). Des exemples de telles affections sont les adénomes, les carcinomes, les cancers constatés dans la prostate, le poumon, le foie, le pancréas, le cerveau, le sein et la peau, ainsi que la leucémie.

Une quantité thérapeutiquement efficace dépend de l'état traité et de la voie d'administration choisie, ainsi que de l'activité spécifique du composant utilisé et sera décidée finalement par le médecin ou le vétérinaire traitant. La (+)sclaréolide est administrée en une quantité de 0,1 à 500 mg/kg de poids corporel du patient (par exemple, 1 à 100 mg/kg de poids corporel du patient).

Alors qu'il est possible d'administrer la (+)sclaréolide sous la forme du composé pur ou substantiellement pur, ce produit peut aussi être présenté sous forme de formulation, de préparation ou de composition pharmaceutique. Les formulations à utiliser dans la présente invention, à la fois pour les êtres humains et les animaux, comprennent la (+)sclaréolide associée à un ou plusieurs support(s) pharmaceutiquement acceptable(s) de cette dernière et optionnellement d'autres ingrédients thérapeutiques. Le support doit être "acceptable", c'est-à-dire compatible avec l'ingrédient (ou les ingrédients) actif(s) de la formulation et non nocif pour le sujet à traiter.

Les formulations peuvent être commodément présentées sous une forme à dosage unique et peuvent être préparées par l'une quelconque des méthodes bien connues dans l'art de la pharmacie. Toutes les méthodes comprennent la phase consistant à mettre la (+)sclaréolide en association avec un support qui peut contenir un ou plusieurs ingrédients accessoires. En général, les compositions destinées à la fabrication de comprimés (par exemple pour administration orale) ou de poudres, sont préparées par mélange uniforme et intime de la (+)sclaréolide avec des supports solides finement divisés, suivi si nécessaire, comme dans le cas des comprimés, d'une mise en forme du produit pour lui donner la forme et la dimension désirée.

Les compositions convenant pour l'administration parentérale (par exemple, sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire), par ailleurs, comprennent commodément des solutions aqueuses stériles dans laquelle la (+)sclaréolide est soluble. De préférence, les solutions sont isotoniques avec le sang du sujet à traiter. Ces compositions peuvent être commodément préparées par dissolution de la (+)sclaréolide dans une solution

aqueuse de ce genre, ladite solution étant ensuite rendue stérile. La composition peut être présentée en conteneurs à dose unique ou multiple, par exemple des ampoules ou des fioles scellées.

En conséquence, l'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant, comme principe actif, la (+)sclaréolide en association avec un ou plusieurs support(s) pharmaceutiquement acceptable(s).

Un autre objet de l'invention est de revendiquer l'utilisation de la (+)sclaréolide pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des affections caractérisées par la prolifération excessive des cellules. Des exemples de telles affections sont la fibrose, l'hyperplasie prostatique bénigne, l'athérosclérose, la resténose, la glomulérosclérose, la chéloïde, le psoriasis et d'autres affections de la peau et maladies néo-plastiques non malignes, les adénomes, les carcinomes, les cancers constatés dans la prostate, le poumon, le foie, le pancréas, le cerveau, le sein et la peau, ainsi que la leucémie.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation de la (+)sclaréolide comme un médicament dans une méthode de traitement.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront au cours de la description détaillée de l'invention et dans les revendications.

On considère qu'un spécialiste peut, sur la base de la présente description, utiliser la présente invention dans sa totalité. Les configurations spécifiques suivantes doivent, par conséquent, être interprétées comme purement illustratives et non limitatives du reste de la divulgation, de quelque manière que ce soit.

A moins qu'ils aient une autre définition, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par une personne de compétence ordinaire dans la technique à laquelle cette invention appartient. De même, toutes les publications, demandes de brevet et autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.

La (+)sclaréolide

La (+)sclaréolide est disponible auprès d'un certain nombre de sources du commerce, par exemple Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO. La (+)sclaréolide peut également être préparée par synthèse, par exemple à partir de (-)sclareol (Aldrich Chem. Co.) ou d'acide homofarnésylique. Voir, par exemple, Coste-Maniere et ses collaborateurs,

Tetrahedron Letters, 29(9) : 1017 (1988), Mantres et ses collaborateurs, Tetrahedron Letters 34(4) : 629 (1993) ; brevets allemands Nos. DE 4 301 555 et DE 3 942 358 ; et demande PCT No. WO 93/21174.

Inhibition de la prolifération de l'hyperplasie prostatique bénigne (HPB)

- 5 Les solutions de (+)sclaréolide ont été préparées par dilution avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) (0,5 %). Le milieu de culture utilisé était un milieu essentiel minimum (MEM, Gibco, Taisley, Royaume-Uni) sans aucun sérum mais auquel on avait ajouté de la L-glutamine (0,6 mg/ml, Gibco), de la gentamycine (40 µg/ml, Gibco), de la pénicilline (100 IV/ml, Gibco), et de la streptomycine (100 µg/ml ; Gibco). La thymidine tritiée
- 10 (dThd ; spec. act., 48 Ci/mme) a été achetée à Amersham (Little Chalfont, Royaume-Uni). Les solutions à ajouter au milieu d'incubation ont été préparées de manière extemporanée par dilution appropriée avec du MEM. Le tissu d'HPB a été obtenu de 10 patients (fourchette d'âge : 56-80 ans ; âge moyen \pm déviation standard : 68 \pm 12) possédant des prostates précédemment non traitées, qui avaient subi une
- 15 prostatectomie tétropubique ouverte. Les spécimens ont été reçus frais de la salle d'opération dans du MEM maintenu à 4° C pendant 1-3 heures avant d'être traités pour culture d'organe tel que présenté en détail dans de Launoit Y. et ses collaborateurs, The Prostate, 13 : 143 (1988). Pour chaque spécimen d'HPB, chaque condition expérimentale a été déterminée au moyen d'une série de 10 morceaux de tissu
- 20 (0,5 - 1 mm³) placés dans une capsule de Pétri (3 cm de diamètre ; Gibco) contenant 2,5 ml de milieu MEM. Ces cultures ont été incubées dans un milieu témoin ou dans un milieu auquel on avait ajouté soit 10 nM de Facteur de Croissance Epithélial (FCE) soit 10 nM de Facteur de Croissance de Fibroblastes basique (FCFb), avec ou sans 10⁻⁴M (concentration finale) de (+)sclaréolide. Du FCE ou du FCFb ont été ajoutés au
- 25 commencement de la culture. La (+)sclaréolide a été ajoutée 24 heures après le FCE ou le FCFb. Les cultures ont été immergées dans de l'EFA fixateur (éthanol 96° (70 % en volume), formol neutre (25 % en volume), acide acétique, (5 % en volume)) à la 72ème heure après le commencement de la culture, c'est-à-dire à la 48ème heure après l'addition de la (+)sclaréolide. De la thymidine tritiée (2 µCi/ml MEM) a été ajoutée au
- 30 milieu de culture 4 fois, à savoir, 36 heures, 24 heures, 12 heures et 1 heure avant fixation.

La méthode de marquage avec la thymidine tritiée permet d'estimer les indices de marquage à la thymidine (IMT). L'IMT représente le pourcentage de cellules engagées dans la phase S du cycle de cellules. Cet indice représente donc une estimation indirecte

de la vitesse de prolifération dans un tissu donné. La méthodologie utilisée ici est identique à celle présentée en détail dans de Launoit, Y. et ses collaborateurs, The Prostate, 13 : 143 (1988). L'IMT a été déterminé comme suit. On a coupé deux sections de chaque spécimen d'HPB. L'IMT a été déterminé séparément dans les
5 compartiments stromal et épithélial de chaque HPB. Dans ce but, les comptes d'IMT ont été faits sur 300-800 cellules stromales et 300-800 cellules épithéliales par section d'HPB. Ainsi, au total, 600-1 600 cellules stromales et 600-1 600 cellules épithéliales ont été comptées par spécimen d'HPB et, au total, 6 000-16 000 cellules stromales et
10 6 000-16 000 cellules épithéliales par condition expérimentale. Le marquage nucléaire a été considéré comme positif lorsqu'un noyau a été couvert par un nombre de grains d'argent dont la valeur moyenne était 10 fois plus élevée que celle du fond.

Il a été constaté que la (+)sclaréolide inhibait la prolifération de cellules organotypiques de HPB stimulée par le FCFb à 70 % et inhibait la prolifération de cellules d'HPB stimulée par le Facteur de Croissance Epithélial à 60 % pour une concentration de 10^{-4} M.

15 Inhibition de la prolifération de fibroblastes

On a utilisé une culture de cellules d'embryons de souris (CES) confluentes pour déterminer la prolifération de fibroblastes par mesure de l'incorporation de [3 H] méthyle thymidine dans l'ADN de ces cellules. Les CES ont été mises en suspension dans un milieu essentiel modifié de Dulbecco (DMEM ; Gibco). Le DMEM dans cet essai
20 contenait 1 g/l de glucose, 100 µg/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, et 10 % de sérum de veau fœtal. Des plaques de culture à 24 cavités ont été remplies avec 500 µl de la suspension (70 000 cellules / cavité) et maintenues 24 heures dans un incubateur à 37° C et 5 % de CO₂.

Le jour suivant, le milieu de culture dans chaque cavité a été remplacé par 500 µl de
25 DMEM contenant 0,5 % de sérum de veau fœtal, en vue de réduire la vitesse de reproduction des cellules et de maintenir les cellules dans une phase stationnaire. Le jour suivant, le milieu de culture a été remplacé (1 µl pour chaque cavité) et les cellules ont été stimulées avec du FCFb avec ou sans une solution de concentrations diverses de (+)sclaréolide. Les solutions de (+)sclaréolide ont été préparées par dilution aqueuse avec
30 du DMSO. Le jour suivant, de la [3 H] méthyle thymidine (1 µCi/ml) a été ajoutée et les plaques de culture ont été maintenues pendant 4 heures à 37° C. Le milieu d'incubation a ensuite été enlevé et on a ajouté 1 ml d'acide trichloracétique à 10 % refroidi (ATC, Sigma Chemical). 30 minutes plus tard, à 4° C, l'ATC a été enlevé, les plaques de

- culture ont été rincées avec de l'eau et on a ajouté 500 µl de NaOH (0,3 M) à chaque cavité. Les plaques de culture ont été maintenues à 4° C pendant une nuit. Le jour suivant, les cultures de chaque cavité ont été transférées dans des fioles à scintillation. Le NaOH a été neutralisé avec 500 µl de HCl (0,3N), et la radioactivité des fioles de
- 5 scintillation a été mesurée au moyen d'un compteur à scintillation Beckmann (modèle # L56000SG).

Il a été constaté que la (+)sclaréolide inhibait la prolifération de fibroblastes stimulée par le FCFb, à 50 % pour une concentration de 10^{-7} M et à 70 % pour une concentration de 10^{-5} M.

- 10 Il faut comprendre que, bien que l'invention ait été présentée avec une description détaillée, la description qui précède a pour but d'illustrer et non de limiter le champ d'application de l'invention, qui est défini par le champ d'application des revendications ci-annexées. D'autres aspects, avantages et modifications figurent dans les revendications.

REVENDICATIONS

1. Une méthode de traitement d'une affection caractérisée par une prolifération excessive de cellules chez un patient, ladite méthode comprenant l'administration audit patient d'une quantité thérapeutiquement efficace de (+)sclaréolide.
- 5 2. Une méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite prolifération de cellules est bénigne.
3. Une méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite affection est la fibrose.
4. Une méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite affection est une
10 hyperplasie prostatique bénigne.
5. Une méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie parentérale.
6. Une méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie sous-cutanée.
- 15 7. Une méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie orale.
8. Une méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie parentérale.
9. Une méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est
20 administrée par voie sous-cutanée.
10. Une méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie orale.
11. Une méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie parentérale.

12. Une méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie sous-cutanée.
13. Une méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie orale.
- 5 14. Une méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie parentérale.
15. Une méthode selon la revendication 14, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie sous-cutanée.
- 10 16. Une méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite (+)sclaréolide est administrée par voie orale.
17. Composition pharmaceutique comprenant de la (+)sclaréolide, en association avec un ou plusieurs support(s) pharmaceutiquement acceptable(s).
- 15 18. Utilisation de la (+)sclaréolide pour la préparation d'un médicament pour le traitement d'affections caractérisées par la prolifération excessive de cellules telles que la fibrose, l'hyperplasie prostatique bénigne, l'athérosclérose, la resténose, la glomulérosclérose, la chéloïde, le psoriasis et d'autres affections de la peau et maladies néo-plastiques non malignes, les adénomes, les carcinomes, les cancers constatés dans la prostate, le poumon, le foie, le pancréas, le cerveau, le sein et la peau, ainsi que la leucémie.
- 20 19. Utilisation de la (+)sclaréolide selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'hyperplasie prostatique bénigne ou de la fibrose.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC/FR 96/00015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/365

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CANCER LETT., vol. 21, no. 1, 1983, pages 29-35, XP002000469 H. OKAMOTO ET AL.: "Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induc- ed ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis by sweetening agents and related compounds." -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 1996

Date of mailing of the international search report

10.05.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T